

Karsinojenik Etkinin Kısa Süreli Testler ile Saptanması ve Ames Test

Ali Esat KARAKAYA (*)
Asuman KARAKAYA (**)

Özet : Bugün onbinlerce kimyasal bileşik çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve her geçen yıl bu sayı artmaktadır. Bu kadar çok sayıda kimyasal bileşimin karsinojenik etki yönünden taranması ancak kısa süreli karsinojenesite testleri ile mümkündür. Bu makalede kısa süreli karsinojenesite testleri içerisinde en güvenilir sonuç vereni ve en yaygın kullanılanı olan, Salmonella/memeli mikrozomu mutajenesite testi (Ames test) tanıtılmıştır. Ayrıca Ames test ile uzun süreli karsinojenesite testleri arasındaki uyum ve farkların nedenleri incelenmiş, Ames testin uygulama alanları özetlenmiştir.

DETERMINATION OF THE CARCINOGENIC ACTIVITY BY SHORT TERM TESTS AND THE AMES TEST

Summary : Currently tens of thousands of chemicals are used for various purposes and their numbers are constantly increasing. The screening of such a large number of chemicals for carcinogenic activity is only possible by short - term tests. In this article, the Salmonella/mammalian - microsome mutagenicity test (Ames test), the most reliable and widely used one among short - term carcinogenicity tests, has been reviewed. The reasons for similarities and differences between the results of the Ames test and long - term carcinogenicity tests are also discussed and the applications of the former have been summarized.

GİRİŞ

Endüstri, tarım, tıp ve evlerde çeşitli amaçlar için kullanılan kim-

yasal bileşiklerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu artış özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısında baş

(*) G.Ü., Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Etiler - Ankara.

(**) A.Ü., Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Tandoğan - Ankara.

döndürücü bir hıza erişmiştir.

Bugün çeşitli amaçlar için kullanılan kimyasal bileşik sayısının 63.000 kadar olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayının yaklaşık 4000 ini ilaç aktif maddeleri, 2000'ini ilaç yardımcı maddeleri, 1500 ünü pestisit aktif maddeleri, 2500 kadarını ise, besin katkı maddeleri oluşturmaktadır (1). Çeşitli etkileşmeler ile çevrede kirlilik olarak oluşan kimyasal bileşiklerin varlığında düşünüldüğünde, temasta bulunabileceğimiz kimyasal bileşik sayısı daha da artmaktadır. Diğer yandan, Chemical Abstracts'da her yıl 200.000 civarında yeni kimyasal bileşik sentezi bildirilmekte ve bunlar içinden de en az 1000 kadarı yeteri miktarlarda üretilerek çeşitli alanlarda kullanım şansı aramaktadırlar (2, 3). Kısaca özetlemek gerekirse, çağımız insanı çevresi kimyasal bileşikler ile sarılmış olarak yaşamaktadır. Önümüzdeki yıllarda insan çevresini saran bu kimyasal kuşağın daha da daralacağı kolaylıkla ileri sürülebilir. Modern yaşamın vazgeçilmez unsuru olan kimyasal bileşikler ile bu yoğun temas önemli sorunları da beraberinde getirmektedir. Kanserin epidemiyolojisi üzerinde çalışan araştırmacılar kanserin %80 hatta daha fazla oranda nedeninin kimyasal bileşikler olduğunu ileri sürmektedirler ve bu görüşü destekleyen çok sayıda epidemiyolojik veri mevcuttur (4-7). Bu noktada karışımıza, temas ettiğimiz kimyasal bileşikler içerisinde hangileri karsinogenik etkilidir sorusu çıkmaktadır.

Çok halkalı aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozo bileşiklerinde olduğu gibi sınırlı yapı - aktivite ilişkisinden söz edilebilirse de bunun bir kimyasal bileşiğin karsinogenik etkili olup olmadığına karar vermede pratik bir önemi yoktur. Bu konuda tek seçenek karsinogenesisite testidir. Karsinogenesisite testi, deney hayvanlarının; özellikle fare, sıçan, hamster gibi kemiricilerin yaşam sürelerinin önemli bir bölümünü kapsayacak bir şekilde denenecek kimyasal bileşiğe maruz bırakılması ile yapılır. Bir kontrol grubu ile birlikte yürütülen deney sonucunda deney grubunda tümör oluşumu gözlenir (8).

Karsinogenik etkinin iki önemli özelliği, karsinogenesisite testlerinin uzun süreli yapılmasını zorunlu kılar. Bu özelliklerden ilki, karsinogenik cevabın gecikmiş bir cevap oluşudur. Diğer bir deyişle, kimyasal karsinogenin uygulanmasından sonra latent dönem denilen ve canlının toplam yaşam süresinin önemli bir bölümünü kapsayan bir sürenin geçmesi gerekir. İkinci özellik ise, bazı durumlarda birkaç büyük doz yerine, sürekli uygulanan küçük dozların daha etken oluşudur (9). Test süresinin uzun olması, deney gruplarında çok sayıda hayvan kullanılması, türler arasındaki biyotransformasyon farklılıklarından kaynaklanan hatalardan kaçınmak için birden fazla tür kullanılması gibi koşullar ve patolojik inceleme zorlukları nedeni ile karsinogenesisite testleri maliyetleri yüksek olan testlerdir. Bir

tek kimyasal bileşimin karsinogenesite testi için gerekli harcamanın 500.000 Amerikan Doları'na ulaştığı hesaplanmaktadır (10). Böyle bir karsinogenesite testi yapılabilmesi için gerekli süre ise 2-3 yıldır.

Pahalı ve uzun süreli olmalarının yanısıra bu testler için yeterli olanaklara sahip laboratuvarların sayısının sınırlı olması nedeni ile her yıl ancak 150 kadar kimyasal bileşimin karsinogenesite testi yapılabilmektedir (5). Çeşitli amaçlar için kullanılan ancak büyük bölümü karsinogenesite testlerinden geçmemiş olan onbinlerce kimyasal bileşik ve bunlara her yıl eklenen yenileri dikkate alındığında, yılda gerçekleştirilebilen 150 karsinogenesite testinin gereksinimi karşılamaktan uzak olduğu kolayca anlaşılabilir. Kapasite ve gereksinim arasındaki bu dengesizlik, araştırmaları kısa süreli karsinogenesite testleri üzerinde yoğunlaştırmıştır.

Kanser oluşumunda somatik mutasyon teorisinin önem kazanması, karsinogenesite testlerinde mikroorganizmalar veya memeli hücreleri kültürü kullanılması ile de geçerli sonuçlara ulaşılabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir. Genotoksik özellikli kimyasal karsinogen ile tümör oluşumu, DNA ile kimyasal karsinogenin etkileşmesi sonucu DNA'da meydana gelen değişim ile başlamaktadır. Bu değişim, yanlış baz çiftleşmesi ve hatalı replikasyon ile devam eden ve sonuçta tümör oluşumuna kadar uzanan bir yolun ilk adımıdır (11).

İlk basamak DNA'daki değişim olduğuna göre hücrede bu değişimin saptanabilmesi deney hayvanında tümör oluşumunun gözlenmesi kadar değer taşıyabilir. Bu yaklaşım, karsinogenesite testlerinde mikroorganizmalardan ve memeli hücreleri kültürlerinden faydalanılması sonucunu getirmiştir.

Kimyasal karsinogen olarak kabul edilen bileşiklerin tümü genotoksik özellikli değildir. Diğer bir deyişle DNA ile etkileşme ve onu değiştirme yeteneği olmayan ancak, başka mekanizmalar ile karsinogenik etki gösteren kimyasal bileşikler de mevcuttur. Epigenetik tip kimyasal karsinogenler olarak adlandırılan bu bileşiklere asbest gibi katı hal karsinogenleri, dietilstilbestrol, estradiol gibi hormonlar ile azotiyopirin gibi immünoşüpresörler örnek olarak verilebilir (9). Doğal olarak, mikroorganizmalar ve memeli hücreleri kültürleri ile yapılan kısa süreli karsinogenesite testlerinin epigenetik tip kimyasal karsinogenler için bir değeri yoktur. Ancak bir değerlendirme yaparken epigenetik tip kimyasal karsinogenlerin sayısının genotoksik tip kimyasal karsinogenlere kıyasla çok daha az olduğu göz önünde tutulmalıdır.

Kısa süreli karsinogenesite testleri arasında en güvenilir sonuç vereni ve dolayısıyla en yaygın kullanılanı Salmonella/memeli mikroozomu mutajenesite testidir (12). Bu yöntem, Ames test olarak kurucusunun adı ile de anılmaktadır.

AMES TEST

1975 yılında Ames ve ark. (13) tarafından yayınlanan bu yöntem, bakteri mutasyonu sonucu oluşan mutant kolonilerin saptanmasına dayanmaktadır. Testte *Salmonella typhimurium*'dan elde edilen mutant suşlar kullanılmıştır. Bu mutant suşlar üreyebilmek için besi yerinde histidine gereksinim duymaktadırlar. Ancak ortamda bir mutajen varlığında bu suşlar mutasyona uğramakta ve besi yerinde histidin olmasa bile üreyebilmektedirler. Bu mekanizma ile Ames test, mutajenik aktiviteyi ölçer görünmekte ise de, mutajenik etki ile karsinojenik etki arasındaki korelasyon Ames testin bir karsinojenesite testi olarak da kullanılmasına olanak sağlar. Yapılan çalışmalar bilinen kimyasal karsinojenlerin %90'ının Ames testte mutajenik aktivite gösterdiğini belirlemiştir (14-16). Diğer bir deyişle karsinojenik aktivitesi olan bir bileşiğin Ames testte pozitif sonuç vermeme olasılığı yaklaşık %10'dur.

Ames testte bir kimyasal bileşiğin mutajenik, dolayısıyla karsinojenik etki yönünden taranmasında TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 1538, TA 98 suş numaraları ile bilinen suşların ayrı ayrı kullanılması önerilmektedir (17). Bu suşlardan TA 1535 ve TA 100 baz - çifti değişimi, TA 1537, TA 1538 ve TA 98 ise kalıp kayması tipi mutasyon için duyarlıdır.

Kimyasal karsinojenlerin büyük bölümü prokarsinojen özelliktedir. Diğer bir deyişle karsinojenik et-

kiden kendileri değil metabolitleri sorumludur (9). O halde geçerli bir sonuca ulaşılabilmesi için test suşu ile yalnızca kimyasal bileşiğin değil, metabolitlerinin de temasa gelmesi sağlanmalıdır. Ames testte bu sorun testin yapıldığı besi yeri içeren petri kutusuna test suşu ile birlikte karaciğer mikrozomal enzimleri ilave edilerek çözülmüştür. Aroclor 1254, fenobarbital veya 3-metilkolantren ile enzim indüksiyonuna uğratılan sıçandan elde edilen karaciğer homojenatının 9000 g fraksiyonu (S-9), üreme ortamına ilave edilmekte, bu yolla karsinojenin metabolize olması sağlanmaktadır (13).

Daha önce de değinildiği gibi, kemiriciler ile yapılan uzun süreli karsinojenesite testlerinde karsinojenik etkileri saptanan bileşiklerin %90'ının Ames testte de pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir (14-16). Sayıları az da olsa, Ames testte pozitif sonuç vermelerine karşın, uzun süreli testlerde karsinojenik etkileri saptanamayan kimyasal bileşikler de mevcuttur (14, 18, 19).

Test sonuçları arasındaki farklılıkların nedenleri iki temel grupta incelenebilir.

1. Uzun süreli karsinojenesite testinde pozitif, Ames testte negatif sonuç :

Daha önce de belirtildiği gibi epigenetik tip kimyasal karsinojenler, mutasyon temelli karsinojenesite testlerinde pozitif sonuç vermezler. Dietilstilbesterol bu gruba örnektir (20, 21).

Biyotransformasyon yönünden in vivo koşullar ile Ames test koşullarının birbirlerine tümüyle uymaması farklı sonuçların bir diğer nedenini oluşturmaktadır. Sikasin, Cycas revoluta'nın tohumlarında bulunan bir glikozittir ve ağıkonu metilazoksimetanol karsinojenik etki gösterir. In vivo koşullarda sikasin barsak mikroflorası bakterileri tarafından salgılanan β glukozidaz enzimi tarafından parçalanır ve metilazoksimetanol oluşur. Sıçanda yapılan karsinogenesite testinde sikasinin karsinojenik etkisi gösterilmiştir (22). Ancak Ames testte kullanılan karaciğer homojenatında β glukozidaz aktivitesi yoktur ve metilazoksimetanol oluşamaz. Bu nedenle Ames testte sikasin negatif sonuç verir (18).

2. Uzun süreli karsinogenesite testinde negatif, Ames testte pozitif sonuç :

In vivo koşullarda var olan tümöre yönelik immün mekanizma bu tip farklı sonuçların başlıca nedenlerindedir. Bir diğer neden ise, biyotransformasyon yönünden farklılıklardır. Örneğin Diklorvos, Ames testte pozitif sonuç verir. Ancak in vivo koşullarda çok çabuk hidroliz olduğu için DNA'da herhangi bir değişim oluşturamaz (23).

Aynı kimyasal bileşiğin bu iki tip testte verdiği sonuçların karşılaştırılmasında uzun süreli karsinogenesite testi sonucunun değişmez doğru olarak kabul edilmesi de bazı hatalı değerlendirmelere yol açabilmektedir. Diğer bir deyişle, uzun süreli karsinogenesite testle-

rinde, deneme koşullarındaki bazı aksaklıklara bağlı olarak karsinojenik etkileri saptanamayan kimyasal karsinojenlerde bulunabilir. Furilfuramid «AF-2» antibakteriyel etkili besin katkı maddesi, etilen diklorür ve etilen dibromür fumigant ve benzin katkı maddesi, [tris (2, 3 - dibromopropil) fosfat] «tris - BP» sentetik tekstil ürünlerinde kolay alev almayı önleyici olarak uzun yıllar kullanılmışlardır. Bu dört bileşik de önceleri yapılan uzun süreli karsinogenesite testlerinde negatif sonuç vermişler ve kullanıma sunulmuşlardır. Ancak Ames test ve diğer kısa süreli karsinogenesite testlerinde pozitif sonuç vermeleri üzerine uzun süreli karsinogenesite testleri tekrarlanmıştır. Tekrarlanan testlerde karsinojenik aktiviteleri saptanan bu bileşiklerin kullanımları da yasaklanmıştır (5, 24, 25).

Ames test, yayınlanmasından günümüze kadar geçen kısa süre içinde aşağıda özetlenen geniş bir kullanım alanı bulmuştur :

1. Farmasötik endüstride ilaç geliştirme çalışmalarında, daha sentez basamağında ilaç adayının mutajenik ve karsinojenik etkisi olup olmadığı araştırılabilmektedir. Bu da sonraki basamaklarda yapılması muhtemel, gereksiz harcamalardan tasarruf sağlamaktadır. Benzer uygulama ve yarar ilaç dışındaki kimyasal bileşiklerin geliştirilmesi çalışmalarında da söz konusudur (5).

2. Ames testin kolay uygulanabilir ve çabuk sonuç veren bir-

yöntem olması, çeşitli amaçlar için kullanılan çok sayıda kimyasal bileşik ve karışımın mutajenik aktivite yönünden taranmasına olanak sağlamıştır. Besin katkı maddeleri (26 - 28), besinlerin ve amino asitlerin piroliz ürünleri (29 - 32), mutajen içerme olasılığı olan besin maddeleri (33 - 36), tütün dumanı kondensatları (37 - 39), mutajen veya promutajene maruz kalmış deneklerin idrar ve feçes ekstraktları (40 - 44), saç boyaları (45), ilaçlar (46), pestisitler (47 - 50) ve endüstride çeşitli amaçlar için kullanılan kimyasal bileşikler (51, 52) ile yapılan çalışmalar bu tip tarama çalışmalarına örnektir.

3. Nanogram düzeyinde duyarlı olması nedeni ile Ames test çevre kirliliği araştırmalarında sıkça kullanılmaktadır. Hava (53 - 60) ve su (61) gibi çevre örneklerinden elde edilen kondensat ve ekstraktların mutajenik aktivitesi Ames test ile saptanabilmektedir.

4. Promutajenlerin metabolizma çalışmalarında aktif metabolitlerin saptanmasında (40, 62, 63) ve amin - nitrit etkileşmesiyle oluşan N - nitrozo bileşiklerinin oluşma koşulları ile, mutajenik etkilerinin araştırılmasında da (64 - 70) Ames testten yararlanılmaktadır.

Son yıllarda Ames testin analitik yöntemler ile kombine edilmesi karışımların mutajenik etki yönünden incelenmesinde kolaylık sağlamıştır. Karışım önce ince tabaka kromatografisinde ayırım işlemine tabi tutulmakta daha sonra da lekeler kazanarak Ames tes-

te uygulanmaktadır. Bu şekilde karışımın içindeki kimyasal bileşiklerden hangisinin mutajenik etkili olduğu saptanabilmektedir (40). Bu konudaki son gelişme ise, Ames testin doğrudan ince tabaka kromatografisi plağında uygulanışdır (71).

(Geliş Tarihi : 3.12.1982)

KAYNAKLAR

1. Maugh, T.H., «Chemicals : How Many Are There?», *Science*, 199, 162, 1979.
2. Goulding, R., «Chemical Hazards in the Home», *Br. Med. Bull.*, 31, 191 - 195, 1975.
3. Arcos, J.C., «Cancer : Chemical Factors in the Environment», *International Laboratory*, 8, 25 - 38, 1978.
4. Weisburger, J.H., «Environmental Cancer : On the Causes of Main Human Cancers», *Texas Reports on Biol. Med.*, 37, 1 - 18, 1978.
5. Ames, B.N., «Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer», *Science*, 204, 587 - 593, 1979.
6. Boyland, E., «The History and Future of Chemical Carcinogenesis», *Br. Med. Bull.*, 36, 5 - 10, 1980.
7. Higginson, J., «Environmental Carcinogenesis», *Arch. Geschwulstforsch.*, 50, 498 - 505, 1980.
8. World Health Organization, «Environmental Health Criteria 6. Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of

- Chemicals**, S. 237 - 244.
Geneva. 1978.
9. Weisburger, J.H., Williams, G. M., «Chemical Carcinogens», Doull, J., Klaassen, C.D., Amdur, M.O., (Eds.), **Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poison**, 2 nd Edition, New York, Macmillan Publishing Co., Inc., S. 84 - 138, 1980.
 10. Clayson, D.B., «Comparison Between In Vitro and In Vivo Tests for Carcinogenicity», **Mutation Res.** 75, 205 - 213, 1980.
 11. Trosko, J.E., Chu, E.H.Y., «The Role of DNA Repair and Somatic Mutation in Carcinogenesis», **Adv. Cancer Res.**, 21, 391 - 425, 1975.
 12. De La Iglesia, F.A., Lake, R.S., Fitzgerald, J.E., «Short - Term Tests for Mutagenesis and Carcinogenesis in Drug Toxicology : How to Test and When to Test Is the Question», **Drug Metabol. Rev.**, 11, 103 - 146, 1980.
 13. Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., «Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian - Microsome Mutagenicity Test», **Mutation Res.**, 31, 347 - 364, 1975.
 14. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., «Detection of Carcinogens as Mutagens in Salmonella/Microsome Test. Assay of 300 Chemicals», **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 72, 5135 - 5139, 1975.
 15. Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., «An Evaluation of Six Short - Term Tests for Detecting Organic Chemical Carcinogens and Recommendations for their Use», **Nature (London)**, 264, 624 - 627, 1976.
 16. Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A., Westwood, F.R., «An Evaluation of Six Short - Term Tests for Detecting Organic Chemical Carcinogens», **Br. J. Cancer**, 37, 873 - 959, 1978.
 17. De Serres, F.J., Shelby, M.D., «The Salmonella Mutagenicity Assay : Recommendations», **Science**, 203, 563 - 565, 1979.
 18. McCann, J., Ames, B.N., «Detection of Carcinogens as Mutagens in Salmonella/Microsome Test : Assay of 300 Chemicals : Discussion», **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 73, 950 - 954, 1976.
 19. Rinkus, S.J., Legator, M.S., «Chemical Characterization of 465 Known or Suspected Carcinogens in the Salmonella typhimurium System», **Cancer Res.**, 39, 3289 - 3318, 1979.
 20. Glatt, H.R., Metzler, M., Oesch, F., «Diethylstilbestrol and 11 Derivatives : A Mutagenicity Study with Salmonella typhimurium», **Mutation Res.**, 67, 113 - 121, 1979.
 21. Lang, R., Redmann, U., «Non Mutagenicity of Some Sex Hor-

- mones in the Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Test», *Mutation Res.*, 67, 361 - 365, 1979.
22. Hirono, I., Laqueur, G., Spatz, M., «Tumor Induction in Fischer and Osborne - Mendel Rats by a Single Administration of Cycasin», *J. Natl. Cancer Inst.*, 40, 1003 - 1010, 1968.
 23. Purchase, I.F.H., «Procedures for Screening Chemicals for Cycasin», *J. Natl. Cancer Inst. Med.*, 37, 1 - 10, 1980.
 24. McCann, J., Ames, B.N., «A Simple Method for Detecting Environmental Carcinogens as Mutagens», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 271, 5 - 13, 1976.
 25. Sugimura, T., «Mutagens, Carcinogens and Tumor Promoters in Our Daily Food», *Cancer*, 49, 1970 - 1984, 1982.
 26. Yahagi, T., Matsushima, T., Nagao, M., Seino, Y., Sugimura, T., Bryan, G.T., «Mutagenicity of Nitrofurans Derivatives on a Bacterial Tester Strain with an R Factor Plasmid», *Mutation Res.*, 40, 9 - 14, 1976.
 27. Brown, J.P., Roehm, G.W., Brown, R.J., «Mutagenicity Testing of Certified Food Colors and Related Azo, Xanthene and Triphenylmethane Dyes with the Salmonella Microsome System», *Mutation Res.*, 56, 249 - 271, 1978.
 28. Ben - Gurion, R., «Mutagenic and Colicine - Inducing Activity of Two Antioxidants: Pyrogallol and Purpurogallin», *Mutation Res.*, 68, 201 - 205, 1979.
 29. Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S., Okamoto, H., «Mutagenic Activity of Amino Acid Pyrolyzates in Salmonella typhimurium TA 98», *Mutation Res.*, 48, 279 - 286, 1977.
 30. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Kawachi, T., Sugimura, T., «Mutagenicities of Protein Pyrolyzates», *Cancer Lett.*, 2, 335 - 340, 1977.
 31. Commoner, B., Vithayathil, A.J., Dolora, P., Nair, S., Madayastha, P., Cura, G.C., «Formation of Mutagens in Beef and Beef Extract During Cooking», *Science*, 201, 913 - 916, 1978.
 32. Matsumoto, T., Yoshida, D., Mizusaki, S., Okamoto, H., «Mutagenicities of the Pyrolyzates of Peptides and Proteins», *Mutation Res.*, 56, 281 - 288, 1978.
 33. Seino, Y., Nagao, M., Yahagi, T., Sugimura, T., Yasuda, T., Nishimura, S., «Identification of a Mutagenic Substance in a Spice, Sumac, as Quercetin», *Mutation Res.*, 58, 225 - 229, 1978.
 34. Lee, J.S.K., Fong, L.Y.Y., «Mutagenicity of Chinese Alcoholic Sprits», *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 575 - 578, 1979.
 35. Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, H., Sugimura, T., «Mutagens in Coffee and Tea», *Mutation Res.*, 68, 101 - 106, 1979.
 36. Takahashi, Y., Nagao, M., Fujino, T., Yamaizuma, Z., Sugi-

- mura, T., «Mutagens in Japanese Pickle Identified as Flavonoids», *Mutation Res.*, 68, 117 - 123, 1979.
37. Mizusaki, S., Takashima, T., Tomaru, K., «Factors Affecting Mutagenic Activity of Cigarette Smoke Condensate in *Salmonella typhimurium* TA 1538», *Mutation Res.*, 48, 29 - 36, 1977.
 38. Sato, S., Seino, Y., Ohka, T., Yahagi, T., Nagao, M., Matsushima, T., Sugimura, T., «Mutagenicity of Smoke Condensates from Cigarettes, Cigars and Pipe Tobacco», *Cancer Lett.*, 3, 1 - 8, 1977.
 39. De Raat, W.K., «Comparison of the Induction by Cigarette Smoke Condensates of Sister-Chromatid Exchanges in Chinese Hamster Cells and of Mutations in *Salmonella typhimurium*», *Mutation Res.*, 66, 253 - 259, 1979.
 40. Hayashida, S., Wang, C.Y., Bryan, G.T., «A Simple Method for Detection and Analysis of Carcinogenic Nitrofurans Compounds and their Metabolites by Combining Chromatography and Spot Mutation Tests», *Gann.*, 67, 617 - 619, 1976.
 41. Minnich, V., Smith, M.E., Thompson, D., Kornfeld, S., «Detection of Mutagenic Activity in Human Urine Using Mutant Strains of *Salmonella typhimurium*», *Cancer*, 38, 1253 - 1258, 1976.
 42. Yamasaki, E., Ames, B.N., «Concentration of Mutagens from Urine by Adsorption with the Nonpolar Resin XAD - 2: Cigarette Smokers Have Mutagenic Urine», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, 3555 - 3559, 1977.
 43. Walker, A.R.P., Richardson, N.J., Ehrich, M., Aswell, J.E., Van Tassel, R.L., Wilkins, T.D., «Mutagens in the Feces of 3 South-African Populations at Different Levels of Risk Colon Cancer», *Mutation Res.*, 64, 231 - 240, 1979.
 44. Burnett, C.M., Fuchs, C.M., Corbett, J.F., «Mutagenicity Studies on Urine Concentrates from Female Users of Dark Hair Color Products», *Drug Chem. Toxicol.*, 2, 283 - 293, 1979.
 45. Ames, B.N., Kammen, H.O., Yamasaki, E., «Hair Dyes Are Mutagenic: Identification of a Variety of Mutagenic Ingredients», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 2423 - 2427, 1975.
 46. Dayan, J., Crajer, M.C., Bertozzi, S., Lefrancois, S., «Application of the *Salmonella typhimurium*/Microsome Test to the Study of 25 Drugs Belonging to 5 Chemical Series», *Mutation Res.*, 77, 301 - 306, 1980.
 47. Carere, A., Ortali, V.A., Cardamone, G., Torracca, A.M., Raschetti, R., «Microbiological Mutagenicity Studies of Pesticides In Vitro», *Mutation Res.*, 57, 277 - 286, 1977.
 48. Seiler, J.P., «Herbicidal Phenylalkylureas as Possible Mutagens. I. Mutagenicity Tests

- with Some Urea Herbicides», *Mutation Res.*, 58, 353 - 359, 1978.
49. Benigni, R., Bignami, M., Care-re, A., Conti, G., Conti, I., Crebelli, R., Dogliotti, E., Gua-landi, G., Noveletto, A., Ortali, V.A., «Mutational Studies with Diquat and Paraquat In Vitro», *Mutation Res.*, 68, 183 - 193, 1979.
 50. Zdzienicka, M., Zielenska, M., Tudek, B., Szymczyk, T., «Mu-tagenic Activity of Thiram in Ames Tester Strains of Sal-monella typhimurium», *Muta-tion Res.*, 68, 9 - 13, 1979.
 51. Hedenstedt, A., Rannug, U., Ra-mel, C., Wachtmeister, C.A., «Mutagenicity and Metabolism Studies on 12 Thiuram and Dithiocarbamate Compounds Used as Accelerators in the Swedish Rubber Industry», *Mu-tation Res.*, 68, 313 - 325, 1979.
 52. Venturini, S., Tamaro, M., «Mu-tagenicity of Antraquinone and Azo Dyes in Ames Salmonella typhimurium Test», *Mutation Res.*, 68, 307 - 312, 1979.
 53. Tokiwa, H., Takeyoshi, H., Mo-rita, K., Takahashi, K., Saruta, N., Ohnishi, Y., «Detection of Mutagenic Activity in Urban Air Pollutants», *Mutation Res.*, 38, 351, 1976.
 54. Tokiwa, H., Morita, K., Take-yoshi, H., Takahashi, K., Ohnis-hi, Y., «Detection of Mutagen-ic Activity in Particulate Air Pollutants», *Mutation Res.*, 48, 237 - 248, 1977.
 55. Dehnen, W., Pitz, N., Tomin-gas, R., «The Mutagenicity of Airborne Particulate Pollut-ants», *Cancer Lett.*, 4, 5 - 12; 1977.
 56. Talcott, R., Wei, E., «Airborne Mutagens Bioassayed in Sal-monella typhimurium», *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, 449 - 451, 1977.
 57. Teranishi, K., Hamada, K., Wa-tanabe, H., «Mutagenicity in Salmonella typhimurium Mu-tants of the Benzene - Soluble Organic Matter Derived from Air - Borne Particulate Mat-ter and its Five Fractions», *Mutation Res.*, 56, 273 - 280, 1978.
 58. Moller, M., Alfheim, I., «Muta-genicity and PAH - Analysis of Airborne Particulate Mat-ter», *Atmospheric Environ-ment.*, 14, 83 - 88, 1980.
 59. Tokiwa, H., Kitamori, S., Ta-kahashi, K., Ohnishi, Y., «Mu-tagenic and Chemical Assay of Extracts of Airborne Particu-lates», *Mutation Res.*, 77, 99 - 108, 1980.
 60. Ohnishi, Y., Kachi, K., Sato, K., Tahara, I., Takeyoshi, H., Tokiwa, H., «Detection of Mu-tagenic Activity in Automo-bile Exhaust», *Mutation Res.*, 77, 229 - 240, 1980.
 61. Neeman, I., Kroll, R., Mahler, A., Rubin, R.J., «Ames Muta-genic Activity in Recycled Wa-ter from an Israeli Water Re-clamation Project», *Bull. Envi-ronm. Contam. Toxicol.*, 24, 168 - 175, 1980.

62. Green, N.R., Savage, J.R., «Seereening of Safrole, Eugenol, their Ninhydrin Positive Metabolites and Selected Secondary Amines for Potential Mutagenicity», *Mutation Res.*, 57, 115-121, 1978.
63. Shudo, K., Ohta, T., Orihara, Y., Okamoto, T., Nagao, M., Takahashi, Y., Sugimura, T., «Mutagenicities of Phenacetin and its Metabolites», *Mutation Res.*, 58, 367 - 370, 1978.
64. Arisawa, M., Fujio, M., Suhara, Y., Maruyama, H.B., «Differential Mutagenicity of Reaction Products of Various Pyrazolones with Nitrite», *Mutation Res.*, 57, 287 - 296, 1978.
65. Hesbert, A., Lemonnier, M., Cavelier, C., «Mutagenicity of Nitrosodiethanolamine on *Salmonella typhimurium*», *Mutation Res.*, 68, 207 - 210, 1979.
66. Lijinsky, W., Andrews, A.W., «The Mutagenicity of Nitrosamides in *Salmonella typhimurium*», *Mutation Res.*, 68, 1 - 8, 1979.
67. Andrews, A.W., Fornwald, J.A., Lijinsky, W., «Nitrosation and Mutagenicity of Some Amine Drugs», *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52, 237 - 244, 1980.
68. Boido, V., Bennicelli, C., Zannacchi, P., De Flora, S., «Formation of Mutagenic Derivatives from Nitrite and Two Primary Amines», *Toxicol. Lett.*, 6, 379 - 383, 1980.
69. De Flora, S., Picciotto, A., «Mutagenicity of Cimetidine in Nitrite-Enriched Human Gastric Juice», *Carcinogenesis*, 1, 925 - 930, 1980.
70. Rao, T.K., Cox, J.T., Allen, B.E., Epler, J.L., Lijinsky, W., «Mutagenicity of N - Nitrosopyrrolidine Derivates in *Salmonella* (Ames) and *Escherichia coli* K-12 (343/113) Assays», *Mutation Res.*, 89, 35-43, 1981.
71. Byorseth, A., Eidsa, G., Gether, J., Landmark, L., Moller, M., «Detection of Mutagens in Complex Samples by the *Salmonella* Assay Applied Directly on Thin - Layer Plates», *Science*, 215, 87 - 89, 1982.